

10/824833

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 11 313 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/32

⑳ Aktenzeichen: 198 11 313.7
㉒ Anmeldetag: 16. 3. 98
㉔ Offenlegungstag: 23. 9. 99

DE 198 11 313 A 1

㉑ Anmelder:
Merckle GmbH, 89079 Ulm, DE

㉓ Vertreter:
Kinzebach und Kollegen, 81679 München

㉒ Erfinder:
Albrecht, Wolfgang, Dr., 89075 Ulm, DE; Bungers,
Eva, Dipl.-Ing., 89250 Senden, DE; Martin,
Wolfgang, Dr., 89233 Neu-Ulm, DE; Guserle,
Richard, Dipl.-Ing., 89359 Kötzing, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Inosin 5'-monophosphat dehydrogenase

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Inosin 5'-monophosphat dehydrogenase (IMPDH) im Blut eines Patienten, das insbesondere zur diagnostischen Überwachung von IMPDH-behandelten Patienten geeignet ist.

Best Available Copy

DE 198 11 313 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Inosin-5'-monophosphat dehydrogenase (IMPDH) im Blut von Patienten sowie die Anwendung dieses Verfahrens zum therapeutischen Monitoring sowie zum Monitoring des immunsuppressiven Status von Patienten, welche mit IMPDH-Inhibitoren behandelt wurden. Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein Testkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Das Enzym Inosin 5'-monophosphat dehydrogenase (IMPDH : NAD Oxidoreductase, E.C. 1.2.1.14) ist das Schlüsselenzym des Biosynthesewegs von Guanin-Nucleotiden. In einer NAD-abhängigen Reaktion wird Inosin 5'-monophosphat (IMP) durch IMPDH zu Xanthosin 5'-monophosphat (XMP) oxidiert. Proliferierende Zellen benötigen hohe Mengen an Guanosin-triphosphat (GTP), so daß die IMPDH-katalysierte Reaktion zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Bereitstellung von GTP wird. Die Biosynthese von Guanin-Nucleotiden wird schematisch in Fig. 1 dargestellt.

In humanem Gewebe sind zwei Formen von IMPDH unterscheidbar. Struktur und katalytische Eigenschaften beider Formen, als Typ I und Typ II bezeichnet, sind gut charakterisiert. Northern-Blot Analysen von mRNA, aus verschiedenem Gewebe isoliert, ergaben, daß beide Isoformen exprimiert werden (Senda M, Natsumeda, Y.: Tissue Differential Expression of Two Distinct Genes for Human IMP Dehydrogenase (E.D.1.1.1.205), Life Sciences 54, Nr. 24, 1917-1926 (1994)). Befunde allerdings, wonach in proliferierenden Zellen quantitativ Typ II-IMPDH überwiegt, in ruhenden Zellen dagegen Typ I, führten zur Klassifizierung in die "konstitutive Typ I-IMPDH" und die "induzierbare Typ II-IMPDH" (Nagai, M., Natsumeda, Y., Weber, G.: Proliferation-linked Regulation of Type II IMP Dehydrogenase Gene in Human Normal Lymphocytes and HL-60 Leukemic Cells, Cancer Research 52, 258-261 (1992)).

In Tumorzellen und proliferierenden Lymphozyten konnten substantiell erhöhte Enzymaktivitäten gemessen werden (Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, Yamaji Y, Ohno S, Suzuki K, Weger G: Expression of Human IMP Dehydrogenase Types I and II in Escherichia coli and Distribution in Human Normal Lymphocytes and Leukemic Cell Lines, The Journal of Biological Chemistry 266, No. 1, 506-509 (1991); Collart FR, Huberman E: Expression of IMP Dehydrogenase in Differentiating HL-60 Cells, Blood 75, No. 3, 570-576 (1990); Collart FR, Chupp CB, Mirkin BL, Huberman E: Increased Inosine-5'-phosphate Dehydrogenase Gene Expression in Solid Tumor Tissues and Tumor Cell Lines, Cancer Research 52, 5826-5828 (1992); Kiguchi K, Collart FR, Henning-Chubb C, Huberman E: Induction of Cell Differentiation in Melanoma Cells by Inhibitors of IMP Dehydrogenase: Altered Patterns of IMP Dehydrogenase Expression and Activity, Cell Growth & Differentiation 1, 259-270 (1990); Stadler PB, Pennacchi J, Sherley JL: Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase Activity is Maintained in Immortalized Murine Cells Growth-Arrested by Serum Deprivation, Advances in Enzyme Regul 34, 91-106 (1994); Huberman E, Glesne D, Collart F: Regulation and Role of Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase in Cell Replication, Malignant Transformation and Differentiation, Advances in Experimental Medicine and Biology 370, 741-746 (1995)). Daher ist die Arzneistoff-vermittelte Hemmung der IMPDH ein möglicher Ansatzpunkt ("target") zur Therapie von Krebserkrankungen und insbesondere zur Immunsuppression nach Organtransplantation.

Das Konzept der Immunsuppression durch IMPDH-Hemmung gründet auf der Tatsache, daß mit Hemmung der IMPDH gezielt die Proliferation der für die Immunantwort verantwortlichen T- und B-Lymphozyten gehemmt werden kann, da beide Zelltypen den "Salvage-pathway" zur Nucleotidsynthese nicht aktivieren können, während andere Zellen den GTP-Pool durch den alternativen Versorgungsweg auffüllen können (Ransom, JT: Mechanism of Action of Mycophenolate Mofetil, Therapeutic Drug Monitoring 17, Nr. 6, 681-684 (1995)).

Mit Bredinin® (Wirkstoff: Mizoribine) und CellCept® (Wirkstoff: Mycophenolat mofetil) wurden zwei IMPDH-Inhibitoren klinisch entwickelt und werden heute erfolgreich zur immunsuppressiven Therapie eingesetzt, wobei Bredinin® bislang nur in Japan zugelassen ist. Ein weiterer Wirkstoff, VX-497 (Pressemitteilung der Fa. Vertex, Cambridge, MA, 2. Dezember 1996), der im Vergleich zu den bislang eingesetzten IMPDH-Inhibitoren wesentlich weniger Nebenwirkungen verursachen soll, soll auch für die Behandlung chronischer Autoimmunerkrankungen, wie Asthma, Psoriasis, rheumatoide Arthritis und systemischen Lupus erythematoses, geeignet sein.

Nachteiligerweise beruht die Dosierung dieser immunsuppressiven Medikamente allein auf Erfahrungen von klinischen Prüfungen und auf deren pharmakokinetischen Eigenschaften. Individuelle Dosisanpassungen sind derzeit nicht möglich, da nach heutigem Kenntnisstand die quantitative Bestimmung des Wirkstoffs in Blut keine Aussage über den immunsuppressiven Status zuläßt. Daher wurde die Bestimmung der IMPDH-Aktivität als pharmakodynamischer Parameter als mögliche Alternative zur Optimierung der Therapie mit IMPDH-Inhibitoren in mehreren Publikationen diskutiert (Langman LJ, LeGatt DF, Yatscoff RW: Pharmacodynamic Assessment of Mycophenolic Acid-Induced Immunosuppression by Measuring IMP Dehydrogenase Activity, Clin Chem 41, No. 2, 295-299 (1995); Langman LJ, Shapiro AJ, Lakey RT, LeGatt DF, Kneteman NM, Yatscoff RW: Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid induced immunosuppression by measurement of IMP dehydrogenase in a canine model, Transplantation 61, 87-92 (1996); Langman LJ, LeGatt DF, Halloran PF, Yatscoff RW: Pharmacodynamic Assessment of Mycophenolic Acid-Induced Immunosuppression in Renal Transplant Recipients, Transplantation 62, 666-672 (1996); Langman LJ, Nakakura H, Thliveris JA, LeGatt DF, Yatscoff RW: Pharmacodynamic Monitoring of Mycophenolic Acid in Rabbit Heterotopic Heart Transplant Model, Therapeutic Drug Monitoring 19, 146-152 (1997)).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden zur Messung der IMPDH-Enzymaktivität publiziert. Diese sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Publizierte Verfahren zur Bestimmung der IMPDH-Aktivität

Substrat	Meßkompartiment	Meßprinzip	Methode
IMP	(partiell) gereinigtes Enzym	photometrische Bestimmung von gebildetem NADH	[1]
[8- ¹⁴ C]-IMP	Zellhomogenate und Enzymrohextrakte	Trennung von Substrat und Produkt mittels Papier-Elektrophorese und anschl. Szintillationsmessung	[2], [3]
[2,8- ³ H ₂]-HX [2,8- ³ H ₂]-Ino	Lymphozyten und Vollblut	Messung des bei der Reaktion freigesetzten ³ H	[4], [5]
IMP	Zell-Lysate von Erythrozyten	quantitative Bestimmung von XMP mittels HPLC	[6]

Die Methoden [1]–[6] sind in den folgenden Literaturstellen näher erläutert:

Methode [1]: Hager PW, Collart FR, Huberman E, Mitchell B: Recombinant Human Inosine Monophosphate Dehydrogenase Type I and Type II Proteins, *Biochemical Pharmacology* 49, No. 9, 1323–1329 (1995);

Methode [2]: Ikegami T, Natsumeda Y, Welor G: Direct assay method for inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity, *Anal Biochem* 150, 155–166 (1985);

Methode [3]: Proffitt RT, Pathak VK, Villacorte DG, Presant CA: Sensitive radiochemical assay for inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and determination of activity in murine tumor tissue extracts, *Cancer Res* 43, 1620–1623 (1983);

Methode [4]: Langman LJ, LeGatt DF, Yatscoff RW: Pharmacodynamic Assessment of Mycophenolic Acid-Induced Immunosuppression by Measuring IMP Dehydrogenase Activity, *Clin Chem* 41, No. 2, 295–299 (1995);

Methode [5]: Balzarini JB, de Clercq E: Assay method for monitoring the inhibitory effects on antimetabolites on the activity of inosine dehydrogenase in intact human CEM lymphocytes, *Biochemistry* 287, 785–790 (1992);

Methode [6]: Montero C, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB, Micheli V, Cant AJ, Morgan G: Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method., *Clin Chem Acta* 238, 169–178 (1995).

Das Verfahren von Balzarini und de Clercq (Methode [5]), das auf der Verwendung von [³H]-markiertem Hypoxanthin oder [³H]-markiertem Inosin beruht und aufgrund der Membrangängigkeit von Hypoxanthin (HX) und Inosin (Ino) mit intakten Zellen durchgeführt wird, wurde von der Arbeitsgruppe von Yatscoff weiterentwickelt (Methode [4]) und als Möglichkeit zum pharmakodynamischen Monitoring vorgestellt. Die Autoren führten die Untersuchungen jedoch in aus Vollblut gewonnenen Zellfraktionen durch und berichteten, daß die in diesem Kompartiment bestimmte Aktivität auch die in Lymphozyten vorhandene Aktivität repräsentiere. Aus eigenen Untersuchungen der Anmelderin geht jedoch hervor, daß diese Aussage zwar für Vollblut von gesunden Versuchspersonen zutrifft und somit auch für die beschriebenen Tierexperimente, in deren Rahmen ein IMPDH-Inhibitor einmalig verabreicht wurde, zutreffen kann. Bei Transplantationspatienten allerdings, denen ein IMPDH-Inhibitor täglich verabreicht wird, konnte dieser Befund durch die Untersuchungsergebnisse der Anmelderin überraschenderweise nicht bestätigt werden.

Ein weiterer Nachteil ist darin zu sehen, daß Hypoxanthin (HX) auch Substrat der ubiquitär vorkommenden Xanthin-Oxidase (XO) ist. Bei der XO-vermittelten Oxidation von HX zu Xanthin und weiter zu Harnsäure wird aus dem Substrat [2,8-³H₂]-HX ebenfalls ³H freigesetzt. Sollte diese Reaktion in größerem Umfang ablaufen, repräsentiert das gemessene Tritium nicht nur die IMPDH-, sondern auch die XO-Aktivität.

Die Methode [4] ist demnach zur IMPDH-Aktivitätsbestimmung in mit IMPDH-Inhibitoren behandelten Transplantationspatienten nicht geeignet. Ursache hierfür ist, daß die IMPDH-Aktivität in Erythrocyten von gesunden Personen sehr gering ist, unter Therapie mit IMPDH-Inhibitoren jedoch auf ein Vielfaches des Basiswerts ansteigt und die in Lymphocyten vorhandene Aktivität völlig überlagert. Außerdem erfordern die Methoden [4] und [5] den Einsatz tritierter Verbindungen, was gesundheitlich bedenklich ist und außerdem aufwendige Sicherheitsmaßnahmen erfordert. Gleiches gilt für die Verwendung des teuren Kohlenstoffisotops ¹⁴C gemäß den Verfahren nach den Methoden [2] und [3]. Die Methode [1] erfordert die aufwendige Reinigung der IMPDH und die Methode [6] mißt lediglich die IMPDH-Aktivität in Erythrozyten. Die Methoden [4] und [5] besitzen außerdem den konzeptionellen Nachteil, daß aufgrund der verwendeten Substrate (Hypoxanthin und Inosin) die der eigentlichen IMPDH-katalysierten Reaktion vorgeschalteten enzymatischen Umsetzungen im Test miteerfaßt werden. Störungen dieser vorgeschalteten enzymatischen Umsetzungen bergen die potentielle Gefahr einer Fehlinterpretation der ermittelten Messergebnisse.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität des Enzyms IMPDH bereitzustellen, das die oben beschriebenen Nachteile des Standes der Technik vermeidet.

Die vorliegende Aufgabe wird überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von IMPDH im Blut eines Säugers, insbesondere eines Menschen, das dadurch gekennzeichnet

ist, daß man mit einem Lysat einer mononukleäre Zellen enthaltenden Zellfraktion aus dem Blut des Säugers eine IMPDH-katalysierte enzymatische Reaktion in einem radioaktivitätsfreien Reaktionsansatz durchführt und aus der pro Zeiteinheit gebildeten Menge eines dabei entstehenden nicht-radioaktiven Reaktionsprodukts die IMPDH-Aktivität im Blut des Säugers ermittelt.

- 5 Der verwendete Reaktionsansatz umfaßt dabei wenigstens ein nicht-radioaktives Substrat für IMPDH und gegebenenfalls wenigstens ein nicht-radioaktives Cosubstrat für IMPDH.

Ein besonders bevorzugt eingesetztes Substrat ist Inosin-5'-monophosphat (IMP), welches von IMPDH in Gegenwart des Cosubstrats Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) unter Bildung von NADH in Xanthosin-5'-monophosphat (XMP) umgewandelt wird. Aus der Menge an gebildetem XMP (i.e. Produkt) bzw. NADH (i.e. Coprodukt) kann anschließend
10 auf die IMPDH-Aktivität in der untersuchten Blutprobe zurückgerechnet werden. Die genaue Auswertung wird später durch Angabe von Berechnungsformeln detailliert erläutert. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf die Verwendung von IMP als Substrat beschränkt. Genauso denkbar ist die Verwendung nicht-radioaktiver IMP-Analoga, d. h. von Verbindungen, welche von IMPDH ebenfalls umgesetzt werden.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden dem Lysat als nicht-radioaktives Substrat IMP und als nicht-radioaktives Cosubstrat NAD in geeigneten Konzentrationen, wie z. B. im Bereich von 0,1 bis 10 mM, zugesetzt. Eine bevorzugte NAD- bzw. IMP-Konzentration liegt z. B. bei etwa 0,25 mM. Die gewählte Substrat- bzw. Cosubstratkonzentration sollte jedenfalls so gewählt sein, daß im jeweiligen Beobachtungszeitraum, wie z. B. 5 min bis 2 h, der Anstieg von XMP bzw. NADH, im Reaktionsansatz linear verläuft.

Vorzugsweise führt man die IMPDH-katalysierte enzymatische Reaktion außerdem in Gegenwart von Allopurinol und/oder EDTA durchführt, um gegebenenfalls Verfälschungen der Meßergebnisse vorzubeugen (was später noch näher erläutert werden wird).

Die Auswertung des Nachweisverfahrens erfolgt vorzugsweise dadurch, daß man die Menge eines bei der enzymatischen Reaktion gebildeten nicht-radioaktiven Produkts (i.e. Reaktionsprodukt des eingesetzten Substrats) und/oder eines nichtradioaktiven Coprodukts (i. e. Reaktionsprodukt des eingesetzten Cosubstrats) direkt oder nach deren weiteren chemischen oder enzymatischen Umsetzung, vorzugsweise quantitativ, bestimmt. Eine chemische oder enzymatische Umsetzung ist immer dann empfehlenswert, wenn dadurch ein einfacheres, störungsfreieres oder empfindlicheres Nachweisverfahren für die zu analysierende Substanz ermöglicht wird.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform bestimmt man bei der Auswertung des erfindungsgemäßen Verfahrens das gebildete XMP, und zwar vorzugsweise nach chemischer Deglycosidierung zu Xanthin und Ermittlung
30 der Xanthinmenge. Eine andere bevorzugte Ausführungsform umfaßt die Bestimmung des gebildeten NADH's.

Die Mengenbestimmung des jeweils untersuchten Analyten kann dabei chromatographisch, photometrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch erfolgen. Die Xanthinbestimmung erfolgt vorzugsweise chromatographisch; die NADH-Bestimmung erfolgt dagegen vorzugsweise photometrisch.

Die zur gebildeten XMP-Menge proportionale Menge an gebildetem NADH kann beispielsweise spektrophotometrisch durch Bestimmung der Extinktion bei 340 nm ermittelt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die gebildete NADH-Menge unmittelbar durch Fluorimetrie zu bestimmen. Zu diesem Zweck induziert man mit einer Anregungswellenlänge von z. B. 340 nm im Reaktionsgemisch Fluoreszenz und bestimmt bei einer Wellenlänge von z. B. 460 nm das emittierte Licht mit Hilfe eines Fluorimeters (vgl. z. B. Gleeson, M. et al., *Clinica Chimica Acta*, 166 (1987) 163-169). Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit ist es außerdem denkbar, einen gekoppelten optischen Test durchzuführen.
40 Ein geeignetes Testsystem stellt beispielsweise ein Biolumineszenz-Testsystem, basierend auf den Enzymen Flavindehydrogenase und bakterieller Luciferase, dar. Bei diesem System werden die anfallenden NADH-Reduktionsäquivalente mit Hilfe des Enzyms Flavindehydrogenase in Gegenwart von Flavinmononukleotid (FMN) in FMNH₂ überführt. Bakterielle Luciferase setzt FMNH₂ in Gegenwart von Luftsauerstoff und einem langkettigen, aliphatischen Aldehyd unter Lichtemission um. Das emittierte Licht ist bei etwa 490 nm nachweisbar und dem gebildeten NADH proportional (vgl. Holme, D. J. und Peck, H. *Analytical Biochemistry* (1983) Longman Group Ltd. Hrsg. S. 272. ff; Wieland, E. et al., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (1985), 23, 99-103).

Die NADH-Bildung kann nicht nur wie oben beschrieben in Lösung durchgeführt werden. Vielmehr ist es auch denkbar, NAD oder geeignete Analoga in an sich bekannter Weise an eine stationäre Phase, wie z. B. einen Teststreifen oder ein Probenröhrchen, zu immobilisieren. Die oben beschriebene IMPDH-Nachweisreaktion wird dann in Gegenwart des
50 immobilisierten NAD's durchgeführt. Zur Beendigung des Tests wird der Reaktionsansatz von der immobilisierten NADH enthaltenden Phase abgetrennt und deren NADH-Gehalt wird in einem geeigneten Analysator, z. B. photometrisch, bestimmt.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des gebildeten NADH's besteht in dessen enzymatischer, NADH Oxidase-katalysierter Umsetzung zu NAD unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Die gebildete Peroxidmenge ist proportional
55 zum gebildeten NADH und kann in verschiedener Weise bestimmt werden. Beispielsweise kann gebildetes Wasserstoffperoxid mittels einer oxidativen Kupplungsreaktion, wie beispielsweise beschrieben in der EP-A-0 530 732, nachgewiesen werden. Es ist aber auch denkbar, das gebildete Wasserstoffperoxid mit einer spezifischen Wasserstoffperoxid-Elektrode zu quantifizieren (vgl. z. B. Tabata, M., et al., *Analytica Chimica Acta* (1994), 298, 113-119). Eine andere Möglichkeit, NADH zu quantifizieren wird von Pandey in *Anal. Biochem.* (1994), 221, 392-396 beschrieben. Es wird vorgeschlagen, die NADH-Bildung mit einer elektrochemischen, durch Tetracyanochinodimethan (TCNQ) vermittelten, Oxidationsreaktion zu koppeln, wobei TCNQ in einer Graphitpasten-Elektrode eingebettet ist.

Zur weiteren Verbesserung der oben beschriebenen Nachweisverfahren für NADH ist die Immobilisierung einzelner oder aller an der jeweiligen Nachweisreaktion beteiligten Enzyme denkbar. Eine Immobilisierung besitzt nicht nur den Vorteil, daß die Nachweisempfindlichkeit der jeweiligen Reaktion erhöht wird. Eine Immobilisierung erhöht außerdem
65 die Lebensdauer der verwendeten Enzyme und ermöglicht deren Wiederverwendung. Dies ist von besonderem Nutzen für eine Automatisierung des Nachweisverfahrens. Hochsensitive NADH-Nachweisverfahren, basierend auf verschiedenen immobilisierten Enzymsystemen werden beispielsweise beschrieben von Girotti, S. et al in *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, (1989) 3, 41-45; Roda, et al., in *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*,

(1989) 4, 423-435; und Ugarova, et al., Anal. Biochem (1988) 173, 221-227.

Eine automatisierte Auswertung des erfindungsgemäßen IMPDH-Tests könnte, ohne darauf beschränkt zu sein, beispielsweise nach folgendem Schema durchgeführt werden:

Nach dem Abstoppen der Reaktion, z. B. durch Zugabe von Säure, wird das NADH-haltige Reaktionsgemisch (Proben-
volumen z. B. 5-100 : 1) mittels eines Samplers auf eine vorkonditionierte stationäre Phase, wie z. B. eine Mikrosäule,
aufgetragen. Auf der stationären Phase, wie z. B. Agarose, Sepharose oder Glasperlen, ist (sind) das (die) für die NADH-
Umsetzung erforderliche Enzym(e), wie z. B. NADH Oxidase, Flavindehydrogenase, bakterielle Luciferase, immobili-
siert.

Bevorzugt man einen auf Peroxid basierenden elektrochemischen NADH-Nachweis, so verwendet man immobili-
sierte NADH-Oxidase als stationäre Phase. Das beim Durchgang durch die stationäre Phase gebildete Wasserstoffper-
oxid gelangt in eine mit einer Wasserstoffperoxid-Elektrode ausgestatteten Durchflußzelle. Der dabei fließende elektri-
sche Strom wird aufgezeichnet und daraus die NADH-Konzentration ermittelt (vgl. Tabata, M. et al. a.a.O.). Nach Ab-
schluß der Messung werden stationäre Phase und Meßzelle durch Waschen und Äquilibrieren auf einen neuen Testzyklus
vorbereitet. Peroxid könnte ebenfalls durch Anregung von Chemilumineszenz, wie von DeLuca, M. und McElroy, W. D.
in Methods Enzymol (1986), 133, 331-584, beschrieben, quantifiziert werden. Es wäre beispielsweise nämlich denkbar,
obige Peroxidelektrode durch eine Chemilumineszenzreaktor zu ersetzen, welcher immobilisierte Peroxidase, wie z. B.
Merettich-Peroxidase, enthält. Das Peroxidgemisch wird vor Einleiten in den Reaktor mit Luminol-haltigem Puffer ver-
setzt. Die Intensität des bei Reaktionsablauf emittierten Lichts wird dann photometrisch bestimmt.

Geeignete Vorrichtungen für eine automatisierte, auf Biolumineszenz basierende photometrische NADH-Analyse sind
beispielsweise von Roda et al., a.a.O. oder Girotti et al., a.a.O. beschrieben worden. Girotti et al., beschreiben einen in ein
Luminometer eingesetzten Biolumineszenzreaktor. Dieser umfaßt als stationäre Phase einen Nylon-Schlauch mit coim-
mobilisierter bakterieller Luciferase und Flavindehydrogenase. Das NADH-haltige Gemisch wird nach Vermischen mit
den für die Nachweisreaktion erforderlichen Cofaktoren (FMN) und Substrate (Decanal) durch den Biolumineszenzreak-
tor geleitet und die Intensität des emittierten Lichts bestimmt. In Abwandlung davon ist auch eine zweistufige Reakti-
onsführung über zwei verschiedene stationäre Phasen, wie von Roda et al. vorgeschlagen, anwendbar. Das NADH-halt-
ige Gemisch versetzt man zunächst mit einem FMN-haltigen Puffer und leitet es über eine erste stationäre Phase an wel-
cher Flavindehydrogenase immobilisiert ist. Das dabei anfallende FMNH₂-haltige Eluat vermischt man mit einem Bio-
lumineszenzsubstrat enthaltenden Puffer und leitet diese Mischung in den Biolumineszenzreaktor, der lediglich Lucife-
rase in immobilisierter Form enthält. Nach Beendigung der Messung werden die stationären Phasen gespült und äquili-
briert und stehen für einen erneuten Testzyklus zur Verfügung.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird nach Abstoppen der Reaktion das gebildete XMP im
Sauren und gegebenenfalls unter Wärmezufuhr zu Xanthin deglycosidiert und die auf diese Weise gebildete Xanthin-
menge chromatographisch, insbesondere durch HPLC-Chromatographie, quantitativ erfaßt. Durch Zugabe von Allopuri-
nol zum Reaktionsansatz wird die unerwünschte, durch Xanthinoxidase katalysierte Bildung von Xanthin aus Hypo-
xanthin verhindert.

In den folgenden Abschnitten wird die Gewinnung der zu untersuchenden Blutproben, die erforderliche Probenvorbe-
reitung, die Durchführung und die Auswertung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens näher erläutert:

Bei der Entnahme der Blutprobe sollte darauf geachtet werden, daß das Entnahmeröhrchen eine anti-koagulierende Sub-
stanz, beispielsweise EDTA oder Li-Heparin, enthält, um ein Gerinnen des Blutes zu vermeiden.

Die Isolierung der mononukleäre Zellen enthaltenden Fraktion erfolgt nach üblichen Verfahren, beispielsweise durch
Zentrifugation und Abdekantieren des Blutplasmas aus der ungerinnbar gemachten Blutprobe. Unter "mononukleären
Zellen" versteht man erfindungsgemäß Lymphozyten und Monozyten.

In einer bevorzugten Ausführungsform isoliert man die mononukleäre Zellen enthaltende Fraktion so, daß nichtmono-
nukleäre Zellen entfernt werden und die so gewonnene Probe im Wesentlichen frei von Erythrozyten, Granulozyten und
Thrombozyten, insbesondere im Wesentlichen frei von Erythrozyten ist. Plasma wird bei dieser Verfahrensvariante eben-
falls abgetrennt. Geeignete Verfahren hierzu sind beispielsweise Dichtezentrifugation über einen Gradienten aus Histo-
paque® oder Dichtezentrifugation über einen Gradienten aus Ficoll und Metrizimid (Hypaque) oder Spezialverfahren,
beispielsweise biomagnetische Separation.

Der erfindungsgemäß isolierten Zellfraktion kann gegebenenfalls ein Aliquot entnommen werden, um die Zellzahl in
üblicher Weise, wie beispielsweise in einer Thoma-Kammer nach Trypan-Blaufärbung, zu bestimmen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Erythrozyten-freie mo-
nonukleäre Zellfraktion vor der Durchführung der Zelllyse in Plasma resuspendiert, das von demselben Säuger (Tier
oder Menschen) erhalten wurde, wie die mononukleären Zellen. Insbesondere erfolgt die Resuspendierung in dem Plas-
maüberstand derselben Blutprobe, die auch die mononukleären Zellen enthielt. Dies gewährleistet, daß das erfindungs-
gemäße in vitro durchgeführte Verfahren eine ex-vivo-Aktivität der IMPDH liefert. Dies ist vor allem dann von Bedeu-
tung, wenn der Proben-Donor mit einem IMPDH-Inhibitor behandelt wurde, der im Blut vorwiegend an Plasmaproteine
gebunden vorliegt. Dies ist Untersuchungen der Anmelderin zufolge insbesondere bei Mycophenolat mofetil bzw. des-
sen freien Wirkstoff Mycophenolsäure (MPA) der Fall. Die Konzentration an freier Mycophenolsäure wird, wie in Fig. 2
dargestellt, sowohl von der Konzentration an Albumin (HSA) als auch von der Konzentration an Mycophenolsäure-Glu-
curonid (MPAG), dem Hauptmetaboliten von MPA, beeinflusst. Darüber hinaus ist generell anzunehmen, daß die Plas-
makonzentration des jeweils verabreichten Wirkstoffs die intrazelluläre IMPDH-Inhibitorkonzentration und damit die
IMPDH-Aktivität signifikant beeinflusst, so daß auch aus diesem Grund die Resuspendierung der Zellen in Plasma von
besonderem Vorteil ist.

Die Bestimmung der ex-vivo-Aktivität mit dem in obiger Weise hergestellten Zell-Lysat erfolgt bevorzugt in einem
nicht-radioaktiven Reaktionsansatz, wie oben beschrieben. Es ist jedoch ebenfalls denkbar den IMPDH-Test mit den aus
dem Stand der Technik bekannten, oben diskutierten radioaktiven Substraten durchzuführen. Das erfindungsgemäße Ver-
fahren zur Bestimmung der ex-vivo-Aktivität von IMPDH ist also grundsätzlich nicht auf die Verwendung nicht-radio-
aktiver Substrate oder Cosubstrate für IMPDH beschränkt.

Analysen zur Verteilung von MPA in Vollblut zufolge sind im Therapie-relevanten Konzentrationsbereich (etwa 2 bis 20 µg/ml, gemessen etwa 30 bis 40 Minuten nach einer Verabreichung von 1 bis 1,5 g b.i.d. des Wirkstoffs Mycophenolat Mofetil) 99,99% des Wirkstoffs in Plasma enthalten, wobei hiervon 1,25% in Plasmawasser gelöst sind und der verbleibende Anteil an Plasmaproteine, vorwiegend HSA, gebunden ist. Etwa 0,01% wurden in der mononukleären Zellfraktion und 0,0005% in Erythrozyten gefunden.

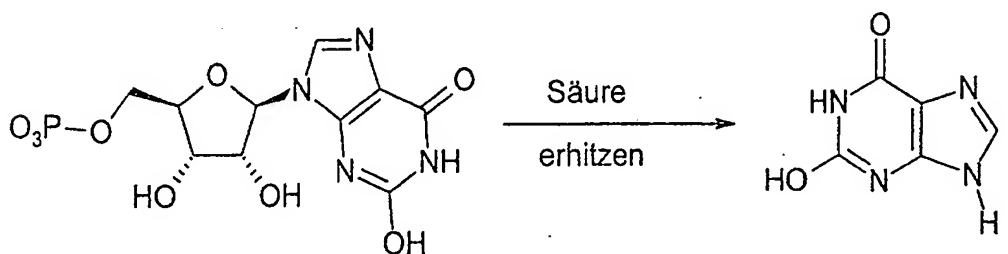
Die Lyse der erfindungsgemäß verwendeten Zellfraktionen wird, gegebenenfalls nach Suspendieren in Plasma, in bekannter Weise durchgeführt. Beispielsweise kann die Zell-Lyse erfolgen durch Schockfrieren in Trockeneis/Isopropanol oder flüssigem Stickstoff und anschließendes Wiederauftauen der Zellen, durch Mischen mit einem Vortex-Mischer, Ultraschallbehandlung, oder eine geeignete Kombination dieser Methoden. Die in der jeweils lysierten Fraktion enthaltene Zellzahl ist nicht kritisch. Geeigneterweise sollte die Zellzahl jedoch im Bereich von etwa $1 \cdot 10^6$ bis etwa $1 \cdot 10^8$, wie z. B. $1 \cdot 10^7$, Zellen liegen.

Vor Durchführung der enzymatischen Reaktion wird das Lysat vorzugsweise mit einem Puffer verdünnt, der EDTA (Ethyldiamintetraacetat) und/oder Allopurinol enthält. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete Puffersysteme sind Tris-Puffer und Phosphat-Puffer, wie Tris-HCl und Kaliumphosphat mit einem pH-Wert im Bereich von etwa 7 bis 8,5 und einer Konzentration im Bereich von etwa 0,005 bis 0,2 Mol/l. Insbesondere können genannt werden: 0,1 M Tris-HCl, pH 8; 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0; oder 0,02 M Tris-HCl, pH 8,3; oder 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4. Durch Zugabe von EDTA werden viele Oxidoreduktasen, nicht jedoch IMPDH gehemmt. EDTA wird in einer Konzentration verwendet, die ausreicht, um die Aktivität von gegebenenfalls vorhandenen, von zweiwertigen Kationen abhängigen Oxidoreduktasen zu inhibieren. Dadurch werden unerwünschte Konkurrenzreaktionen zur IMPDH-Aktivität weitestgehend unterbunden, und das gebildete NADH stellt ein verlässliches Maß für die IMPDH-Aktivität dar. Geeignete EDTA-Konzentrationen liegen z. B. im Bereich von etwa 0,1 bis 10 mM, wie z. B. etwa 1 bis 3 mM. Grundsätzlich kann das erfindungsgemäße Verfahren jedoch auch ohne Beimischung von EDTA durchgeführt werden. Der Xanthinoxidase-Hemmer Allopurinol inhibiert die Oxidation von gegebenenfalls vorhandenem endogenem Hypoxanthin zu Xanthin und Harnsäure und vermeidet so eine Verfälschung der Meßergebnisse. Reproduzierbare Ergebnisse werden insbesondere mit Allopurinol-Konzentrationen zwischen 10 und 200 µg/ml erhalten.

Die Umsetzung des Substrats wird vorzugsweise über einen Zeitraum von 10 bis 120 Minuten, insbesondere 30 bis 90 Minuten durchgeführt. Die Reaktionstemperatur liegt bevorzugt bei etwa 37°C.

Die jeweils geeigneten Testbedingungen, wie Versuchsdauer, Substratkonzentration, sind mit Hilfe geeigneter, dem Fachmann geläufiger Vorversuche in einfacher Weise zu bestimmen. In jedem Fall ist darauf zu achten, daß die enzymatische Umsetzung im Sättigungsbereich des Enzyms mit Substrat, d. h. in einem Substratkonzentrationsbereich durchgeführt wird, in dem der Substratverbrauch bzw. die Produktbildung linear verläuft.

Die IMPDH-katalysierte Reaktion kann in herkömmlicher Weise, beispielsweise durch Zugabe von Säure, Base oder eines organischen Lösungsmittels oder durch Temperaturerhöhung abgestoppt werden. Am geeignetsten ist die Zugabe einer Säure. Insbesondere bevorzugt ist die Zugabe eines Aliquots konzentrierter Perchlorsäure (HClO₄). Durch weitere Zugabe von Perchlorsäure und Erhitzen des Reaktionsansatzes, beispielsweise auf Temperaturen im Bereich von 80 bis 120°C, wie z. B. 100°, erfolgt die säurekatalysierte Spaltung der N-glycosidischen Bindung von XMP.



Xanthosin 5'-monophosphat

Xanthin

Das dabei gebildete Xanthin kann in geeigneter Weise quantitativ bestimmt werden. Besonders bevorzugt führt man die Xanthinbestimmung mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography)-Analyse durch. Grundsätzlich können zur quantitativen Bestimmung jedoch auch andere übliche Meßverfahren eingesetzt werden.

Die Auswertung des erfindungsgemäß bevorzugten, auf die HPLC-Analyse von XMP basierenden Verfahrens wird im folgenden Abschnitt näher erläutert. Ausgehend davon bereitet es dem Fachmann keinerlei Schwierigkeiten abgewandelte Verfahren in analoger Weise auszuwerten.

Bei der Auswertung ist zu unterscheiden, ob die IMPDH-Aktivität in einer mononukleären Zellen enthaltenden Fraktion bestimmt werden soll, die auch andere zelluläre Bestandteile der Blutprobe enthält (Gesamt-Zellfraktion) oder ob, beispielsweise bei einem mit IMPDH-Inhibitoren behandelten Patienten, die zu untersuchende Fraktion frei von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten, insbesondere frei von Erythrozyten ist.

Bestimmung der IMPDH-Aktivität in einem definierten Volumen einer Gesamt-Zellfraktion (WBC-Aktivität):

$$\frac{\Delta \text{XMP} [\text{nmol} / \text{ml}]}{\Delta t [\text{min}]} * f = \text{WBC-Aktivität} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{min} * \text{ml}_{\text{WBC}}} \right],$$

wobei f für einen Verdünnungsfaktor steht, der beispielsweise 5 beträgt, wenn 1 Vol. WBC mit 4 Vol. Tris-EDTA-Allopurinol-Puffer verdünnt wird. ΔXMP errechnet sich aus den nach 60 bzw. 30 Minuten Reaktionszeit gebildeten XMP-Mengen:

$$\Delta XMP [nmol / ml] = \frac{XMP_{60} [ng / ml] - XMP_{30} [ng / ml]}{364.2 [ng / nmol]}$$

Aus der WBC-Aktivität läßt sich wiederum die IMPDH-Aktivität in einem definierten Volumen Vollblut bestimmen:

$$\text{WBC-Aktivität} \left[\frac{nmol}{min * ml_{WBC}} \right] * \frac{HC}{100} = \text{Vollblut-Aktivität} \left[\frac{nmol}{min * ml_{VB}} \right],$$

wobei HC für Hämatokrit [%] steht.

In Vollblut von gesunden Personen ist die IMPDH-Aktivität überwiegend in Leukozyten lokalisiert. Der Vollblut-Assay ermöglicht daher auch die Berechnung einer "apparenten" spezifischen Aktivität in Leukozyten:

$$\frac{\text{Vollblut - Aktivität} \left[\frac{nmol}{min * ml_{VB}} \right]}{\text{Leukozytenzahl} * 10^6 / ml} = \text{spez. Aktivität} \left[\frac{nmol}{min * 1E6 \text{ Leukozyten}} \right]$$

Eine Differenzierung in weitere Subtypen (Lymphozyten, Monozyten etc.) ist grundsätzlich ebenfalls möglich, erfordert jedoch noch weitere Kenntnisse über möglicherweise vorhandene zell-spezifische Unterschiede.

Bestimmung der IMPDH-Aktivität in einem definierten Volumen einer mononukleären Zellfraktion (MNF):
Zur Charakterisierung der IMPDH-Aktivität in Lymphozyten von Patienten, die mit einem IMPDH-Inhibitor über einen längeren Zeitraum therapiert werden, wird die Bestimmung vorzugsweise mit mononukleären Zellfraktionen (MNF) durchgeführt werden. Die Aktivität in dem gemessenen Volumen MNF berechnet sich dann wie folgt:

$$\frac{\Delta XMP [nmol / ml]}{\Delta t [min]} * f = \text{MNF-Aktivität} \left[\frac{nmol}{min * ml_{MNF}} \right],$$

wobei f wie oben definiert ist. Hieraus läßt sich dann die spezifische MNF-Aktivität errechnen:

$$\frac{\text{MNF - Aktivität} \left[\frac{nmol}{min * ml_{MNF}} \right]}{\text{Zellzahl MNF} * 10^6 / ml} = \text{spez. MNF-Aktivität} \left[\frac{nmol}{min * 1E6 \text{ Zellen MNF.}} \right]$$

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum therapeutischen Monitoring von IMPDH-Inhibitor-behandelten Patienten, wobei man in einer Blutprobe des Patienten die IMPDH-Aktivität in der oben beschriebenen Weise bestimmt. Dieses Verfahren ist insbesondere einsetzbar zur individuellen Dosisoptimierung eines IMPDH-Inhibitors. Dabei bestimmt man die IMPDH-Aktivität im Blut eines Patienten bei unterschiedlich hohen Dosierungen des IMPDH-Inhibitors und ermittelt so die im Hinblick auf das Dosis-Wirkungs-Verhältnis optimale Dosierung des IMPDH-Inhibitors ermittelt. Außerdem kann man für jede dem Patienten verabreichte Dosierung die Konzentration des IMPDH-Inhibitors im Blut, insbesondere im Plasma des Patienten, bestimmen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Monitoring des immunsuppressiven Status von IMPDH-Inhibitor-behandelten Patienten, wobei man in einer Blutprobe des Patienten die IMPDH-Aktivität wie oben beschrieben bestimmt. Insbesondere anwendbar ist dieses Verfahren bei Krebspatienten und Organtransplantationspatienten. Vorzugsweise wird das Verfahren eingesetzt bei Patienten, die mit wenigstens einem IMPDH-Inhibitor behandelt werden oder wurden, der ausgewählt ist unter Mycophenolat mofetil, Mycophenolsäure, Tiazofurin, Ribavirin, Mizoribin oder VX-497, insbesondere unter Mycophenolat mofetil und Mycophenolsäure oder Derivaten der Mycophenolsäure, wie z. B. Mycophenolsäureestern, die unter physiologischen Bedingungen hydrolysierbar sind. Beispiele für mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ermittelten IMPDH-Aktivitäten von CellCept®-behandelten Patienten sind in den folgenden Tabellen 2, 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Assay in Vollblut

Bestimmte Aktivität	Cellcept	Patient 1	Patient 2
Aktivität [nmol/(min*ml Lysat)]	- + Differenz	5,679E-01 9,793E-02 -82,8 %	1,210E+00 2,354E-01 -80,5 %
VB-Aktivität [nmol/(min*ml Vollblut)]	- + Differenz	1,988E-01 3,428E-02 -82,8 %	7,020E-01 1,366E-01 -80,5 %
spez. Aktivität [nmol/(min*1E6 Zellen)]	- + Differenz	1,759E-01 3,033E-02 -82,8 %	3,695E-01 7,187E-02 -80,5 %

Tabelle 3

Assay in mononukleärer Zellfraktion

Bestimmte Aktivität	Cellcept	Patient 1	Patient 2
MNF-Aktivität [nmol/(min*ml)]	- + Differenz	1,130E-01 2,631E-02 -76,7 %	1,128E-01 3,648E-02 -67,3 %
spez. Aktivität [nmol/(min*1E6 Zellen)]	- + Differenz	6,422E-03 2,631E-03 -76,7 %	1,516E-02 3,714E-03 -75,5 %
Gesamt-Aktivität [nmol/(min*ml Vollblut)]	- + Differenz	1,246E-02 2,900E-03 -76,7 %	,321E-02 1,058E-02 -75,5 %

Tabelle 4

Assay in Erythrozyten

Bestimmte Aktivität	Cellcept	Patient 1	Patient 2	
Aktivität [nmol/(min*ml)]	-	4,279E-02	1,366E-01	5
	+	1,414E-02	2,403E-02	10
	Differenz	-67,0 %	-82,4 %	
spez. Aktivität [nmol/(min*1E9 Erythrozyten)]	-	4,279E-02	1,366E-01	15
	+	1,414E-02	2,403E-02	
	Differenz	-67,0 %	-82,4 %	
Gesamt-Aktivität [nmol/(min*ml Vollblut)]	-	1,712E-01	8,742E-01	20
	+	5,656E-02	1,538E-01	
	Differenz	-67,0 %	-82,4 %	

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung einen Analysenkit zur Durchführung der erfindungsgemäßen Bestimmungsmethoden, umfassend die für das Bestimmungsverfahren erforderlichen Substrate und gegebenenfalls Cosubstrate sowie gegebenenfalls weitere Reagenzien zum Nachweis der aus den Substraten bzw. Cosubstraten gebildeten Reaktionsprodukte.

Kurze Beschreibung der Figuren:

Fig. 1 Biosynthese von Guanin-Nucleotiden. Ribose-5-phosphat wird über 12 Schritte in IMP umgewandelt. HGPRT steht für Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase.

Fig. 2 Schematische Darstellung der Verteilung von Mycophenolsäure zwischen Lymphozyt (L) und Plasma (P).

Fig. 3 Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs zur Bestimmung der IMPDH-Aktivität in mononukleären Zellen.

Fig. 4 Chromatogramm aus der Bestimmung von Xanthin nach chemischer Hydrolyse von Xanthosin 5'-monophosphat; Bestimmung der IMPDH-Aktivität in mononukleären Zellen, die in Plasma resuspendiert wurden. Reaktionsstop nach 30 min.

Fig. 5 Wie Fig. 4, aber Reaktionsstop nach 90 min.

Fig. 6 Wie Fig. 4 (Doppelbestimmung).

Fig. 7 Wie Fig. 5 (Doppelbestimmung).

Fig. 8 Chromatogramm aus der Bestimmung von Xanthin nach chemischer Hydrolyse von Xanthosin 5'-monophosphat; Bestimmung der IMPDH-Aktivität in mononukleären Zellen, die in Plasma resuspendiert wurden, das den IMPDH-Inhibitor Mycophenolsäure in einer Konzentration von 1 µg/ml enthält. Reaktionsstop nach 30 min.

Fig. 9 Wie Fig. 8, aber Reaktionsstop nach 90 min.

Fig. 10 Wie Fig. 8, aber mit Proben, die von regelmäßig mit Mycophenolat mofetil behandelten Nierentransplantationspatienten stammen. Reaktionsstop nach 30 min.

Fig. 11 Wie 10, aber Reaktionsstop nach 90 min.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie jedoch darauf einzuschränken:

Beispiel 1

Vorbereitung zur Bestimmung der IMPDH-Aktivität in einer Gesamt-Zellfraktion aus Vollblut

In ein Antikoagulans enthaltendes Röhrchen werden 7,5 ml Vollblut aufgefangen und bei Raumtemperatur oder unter leichter Kühlung bei ca. 2000 · g für 10 min zentrifugiert. Das überstehende Plasma wird abdekantiert und die sedimentierte Zellfraktion überschichtende Restplasmamenge mit einer Pasteur- oder Eppendorf-Pipette vorsichtig abgenommen. Von der Zellfraktion werden 2 · 1–1,5 ml Aliquote in Kunststoff-Teströhrchen überführt und durch Eintauchen des Teströhrchens in eine Trockeneis/-Propanol-Mischung oder flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Nach dem Wiederauftauen werden dem Zell-Lysat 4 Volumina Tris-EDTA-Allopurinol-Puffer (24 ml 0,1 M Tris, pH 8,0, 0,1 M KCl, 3 mM EDTA in 1 ml Allopurinol-Lösung (200 µg/ml)) zugegeben. Zur vollständigen Zell-Lyse wird diese Mischung eine Minute am Vortexmixer und anschließend zwei Minuten mit Ultraschall behandelt. Mit je 1 ml des auf diese Weise gewonnenen Zell-Lysats wird die IMPDH-Aktivität in Doppelbestimmung durchgeführt.

Beispiel 2

Vorbereitung zur Bestimmung der IMPDH-Aktivität in isolierten mononukleären Zellfraktionen (MNF)

In Anti-Koagulanz enthaltende Röhrchen werden 20 ml Vollblut aufgefangen und mit 2 Volumina 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt (Ges.-vol.: 60 ml). In sieben 15 ml Zentrifugenröhrchen, in die je 3 ml Histopaque®-Lösung vorgelegt

wurden, werden 8–9 ml des verdünnten Blutes vorsichtig aufgeschichtet. Die Röhrchen werden bei Raumtemperatur (ca. 20°C) und 400 · g 30 Minuten zentrifugiert. Von jedem Röhrchen wird anschließend die überstehende Plasmaschicht bis auf 0,5 cm oberhalb der MNF abgenommen und verworfen. Mit einer Pasteurpipette wird die MNF abgenommen. Die vereinigten MNF werden auf vier neue Zentrifugenröhrchen verteilt und der Inhalt der Röhrchen mit DPBS-Puffer (4,0 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,1 g KH₂PO₄, 0,575 g Na₂HPO₄, 0,5 g D-Glucose, bidest H₂O ad 500 ml) auf 13 ml aufgefüllt. Die in dieser Lösung vorsichtig suspendierten Zellen werden bei 250 · g (10 min, 20°C) sedimentiert, in 10 ml DPBS-Puffer resuspendiert und abermals zentrifugiert (250 · g, 10 min, 20°C). Die sedimentierten Zellen werden in je 1 ml DPBS-Puffer resuspendiert und vereinigt. Aus dieser Suspension werden 50 µl zur Zellzahlbestimmung (Thoma-Kammer nach Trypanblau-Färbung) entnommen. Die Zellsuspension wird nochmals zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Plasma, das vom gleichen Spender durch Zentrifugation von Vollblut gewonnen wurde, resuspendiert und bei 37°C 5 min inkubiert. Anschließend wird der Inhalt des Teströhrchens schockgefroren (Trockeneis/Isopropanol oder flüssiger Stickstoff). Nach dem Wiederauftauen wird das Zell-Lysat mit 4 Vol Tris-EDTA-Allopurinol-Puffer verdünnt und 1 min am Vortexmixer sowie 2 min mit Ultraschall behandelt. Mit je 1 ml des auf diese Weise gewonnenen Zell-Lysats wird die IMPDH-Aktivität in Doppelbestimmung durchgeführt.

Beispiel 3

Enzym-Assay

Je 1 ml Zell-Lysat (aus 1. oder 2.) werden in vier Teströhrchen überführt und jeweils mit 10 µl NAD-Lösung (16,59 mg/ml H₂O; Endkonz. = 0,25 mM) sowie 10 µl IMP-Lösung (8,7 mg/ml H₂O; Endkonz. = 0,25 mM) versetzt. Der Inhalt wird kurz durchmischt; anschließend werden die Röhrchen in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad gestellt. Unter wiederholtem Umschütteln werden je zwei Röhrchen nach 30 min aus dem Wasserbad genommen und zur Beendigung der Reaktion mit 0,15 ml 4 M HClO₄ versetzt. Die beiden anderen Röhrchen werden weitere 30 min (Gesamt-Zellfraktion) oder 60 min (MNF) bei 37°C stengelassen und anschließend ebenfalls mit 0,15 ml 4 M HClO₄ versetzt.

Die Röhrchen werden zentrifugiert (3000 Upm, 10 min, ca. 2000 · g), 700 µl des Überstands werden in ein 10 ml Braunglas überführt und 1 h auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Inhalt kurz homogenisiert und mit 4 M KOH (93 µl für Ansatz mit Lymphozyten, 83 µl für Gesamtblutzellfraktion) versetzt (pH ~2–3). Nach kurzem Homogenisieren und Zentrifugieren (3000 Upm, 10 min, ca. 1400 · g) wird der klare Überstand in ein Braunglasvial überführt und 200 µl hieraus werden zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Das Fließdiagramm in Fig. 3 faßt den gesamten Arbeitsablauf des Enzymassays mit MNF zusammen.

Beispiel 4

HPLC-Bestimmung von Xanthin 5'-Monophosphat (XMP)

4.1. Chromatographische Bedingungen

Säule: 2 Nucleosil C18 (125 × 4,6 mm i.D., dp = 5 µm), in Reihe angeordnet;
 Eluent: 4% Methanol, 96% H₂O (pH 1,8, eingestellt mit conc. H₃PO₄);
 Fließrate: 0,5 ml/min
 Säulentemperatur: Raumtemperatur
 Detektion: UV (λ = 260 nm)
 Retentionszeit: 18–20 min.

4.2. Validierung der chromatographischen Methode

Die quantitative Bestimmung von XMP über Xanthin wird nach international anerkannten Empfehlungen validiert. Das Konzentrations/Signal-Verhältnis ist im Bereich von 25 ng/ml–5000 ng/ml linear (Korrelationskoeffizient > 0,999). Die zur Eichung zu verwendenden Standards werden aus Vollblutzell-Lysat hergestellt. Die nach Vermessung der Eichstandards erhaltenen Konzentration/Signal-Datenpaare werden zunächst zur Bestimmung des endogenen Xanthin-Gehalts verwendet. Anschließend erfolgt die Berechnung der Kalibrierfunktion unter Berücksichtigung des endogenen Spiegels. Bei Vermessung der Proben aus den Enzym-Assays werden zusätzlich Eichstandards und Qualitätskontrollproben analysiert. Selektivitätsuntersuchungen ergeben, daß keine Interferenz mit anderen organischen Basen (Adenin (z. B. aus NAD), Hypoxanthin), Allopurinol oder Harnsäure besteht.

Beispiel 5

HPLC-Chromatogramme aus der Bestimmung von XMP

Die Fig. 4 bis 11 zeigen Chromatogramme, die die Trennung von Xanthin darstellen und zur Quantifizierung von Xanthosin 5'-monophosphat verwendet werden.

Fig. 4 und 5 zeigen die Chromatogramme zur Bestimmung der Enzymaktivität in mononukleären Zellen, die in Plasma resuspendiert werden. Fig. 6 und 7 zeigen die Chromatogramme des gleichen Versuchs, der als Doppelbestimmung durchgeführt wird. In einem parallel durchgeführten Versuchsansatz werden die Zellen in Plasma resuspendiert, das den IMPDH-Inhibitor Mycophenolsäure in einer Konzentration von 1 µg/ml enthält. Das Ergebnis zeigen die Abb. 8 und 9. Das Verfahren wurde außerdem mit Proben durchgeführt, die von regelmäßig mit Mycophenolat mofetil behandelten Transplantationspatienten mit stabiler Nierenfunktion stammen, die das Medikament in einer Dosis von 1 g b.i.d.

über einen Zeitraum von 3 Monaten erhalten haben. Für diese Proben repräsentative Chromatogramme sind in den Abb. 10 und 11 dargestellt.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte wie oben beschrieben.

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Inosin 5'-monophosphat dehydrogenase (IMPDH) im Blut eines Säugers, **dadurch gekennzeichnet**, daß man mit einem Lysat einer mononukleäre Zellen enthaltenden Zellfraktion aus dem Blut des Säugers eine IMPDH-katalysierte enzymatische Reaktion in einem radioaktivitätsfreien Reaktionsansatz durchführt und aus der pro Zeiteinheit gebildeten Menge eines dabei entstehenden nicht-radioaktiven Reaktionsprodukts die IMPDH-Aktivität im Blut des Säugers ermittelt. 10
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionsansatz wenigstens ein nicht-radioaktives Substrat der IMPDH und gegebenenfalls ein nichtradioaktives Cosubstrat der IMPDH umfaßt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Menge eines bei der enzymatischen Reaktion gebildeten nicht-radioaktiven Produkts und/oder eines nicht-radioaktiven Coprodukts direkt oder nach weiterer chemischer oder enzymatischer Umsetzung bestimmt. 15
4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als enzymatische Reaktion die Umsetzung von Inosin 5'-monophosphat (IMP) zu Xanthosin 5'-monophosphat (XMP) in Gegenwart von NAD durchführt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die enzymatische Umsetzung in Gegenwart von Allopurinol und/oder EDTA durchführt. 20
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) das gebildete XMP zu Xanthin chemisch deglycosidiert und die Xanthinmenge bestimmt; oder
 - b) die gebildete NADH-Menge bestimmt.
7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Mengenbestimmung chromatographisch, photometrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch erfolgt. 25
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die mononukleäre Zellen enthaltende Fraktion durch Abtrennung von Plasma erhält.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man außerdem alle nicht-mononukleären Zellen im wesentlichen abtrennt, wobei man eine mononukleäre Zellfraktion (MNF) erhält. 30
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die MNF so isoliert, daß sie frei von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten, insbesondere frei von Erythrozyten, ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die MNF vor oder nach Zell-Lyse durch Zugabe von Plasma rekonstituiert.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß Plasma und MNF von demselben Säuger abgeleitet sind. 35
13. Verfahren zum therapeutischen Monitoring von IMPDH-Inhibitor-behandelten Patienten, dadurch gekennzeichnet, daß man in einer Blutprobe des Patienten die IMPDH-Aktivität mit Hilfe eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 bestimmt.
14. Verfahren zum Monitoring des immunsuppressiven Status von IMPDH-Inhibitor-behandelten Patienten, dadurch gekennzeichnet, daß man in einer Blutprobe des Patienten die IMPDH-Aktivität mit Hilfe eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 9 bis 12 bestimmt. 40
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelten Patienten ausgewählt sind unter Krebspatienten und Organtransplantationspatienten.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Patienten mit wenigstens einem IMPDH-Inhibitor behandelt wurden, der ausgewählt ist unter Mycophenolat mofetil, Mycophenolsäure, Tiazofurin, Ribavirin, Mizoribin oder VX-497, insbesondere unter Mycophenolat mofetil und Mycophenolsäure oder Derivaten der Mycophenolsäure. 45
17. Analysenkit, umfassend die für die Durchführung eines Bestimmungsverfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 erforderlichen nichtradioaktiven Substrate und Cosubstrate und gegebenenfalls weitere Reagenzien zum Nachweis der aus den Substraten oder Cosubstrat gebildeten Reaktionsprodukte. 50

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

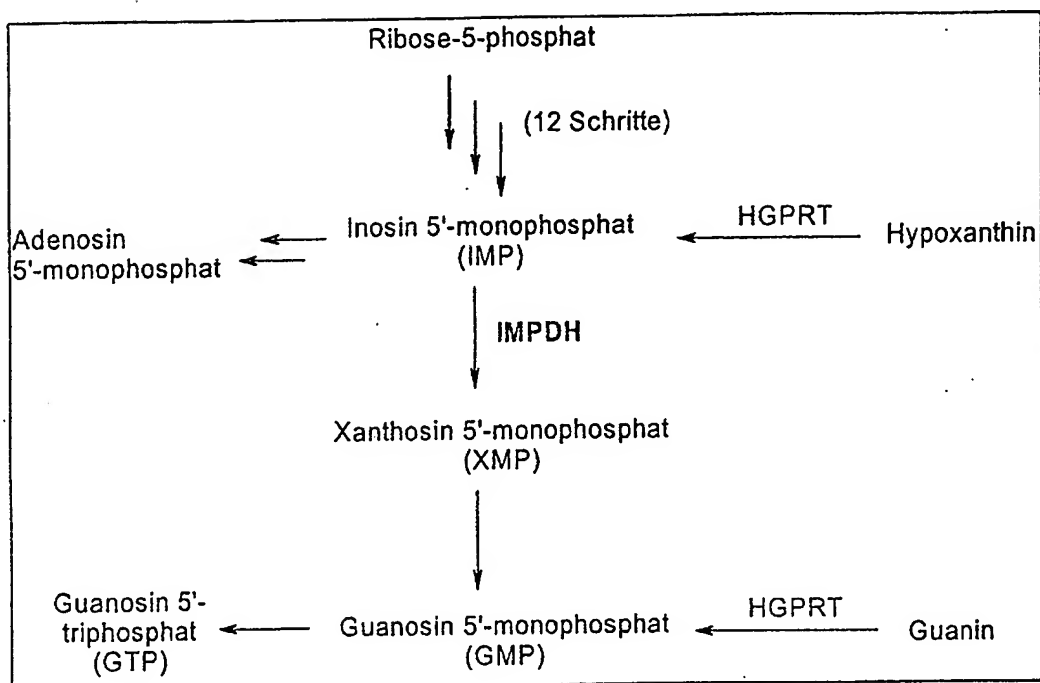


Fig. 1.

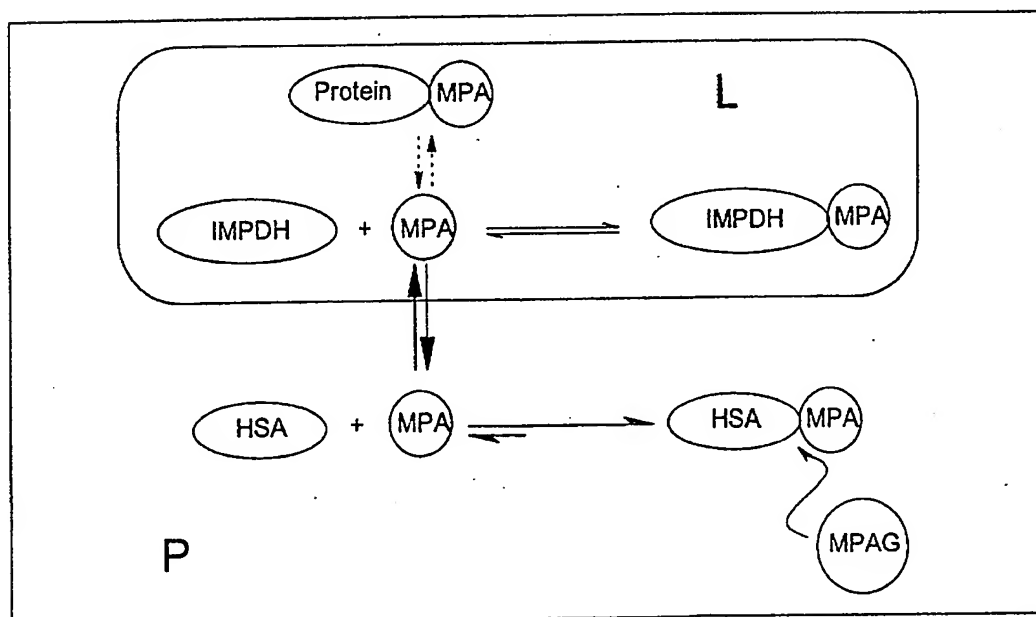


Fig. 2.

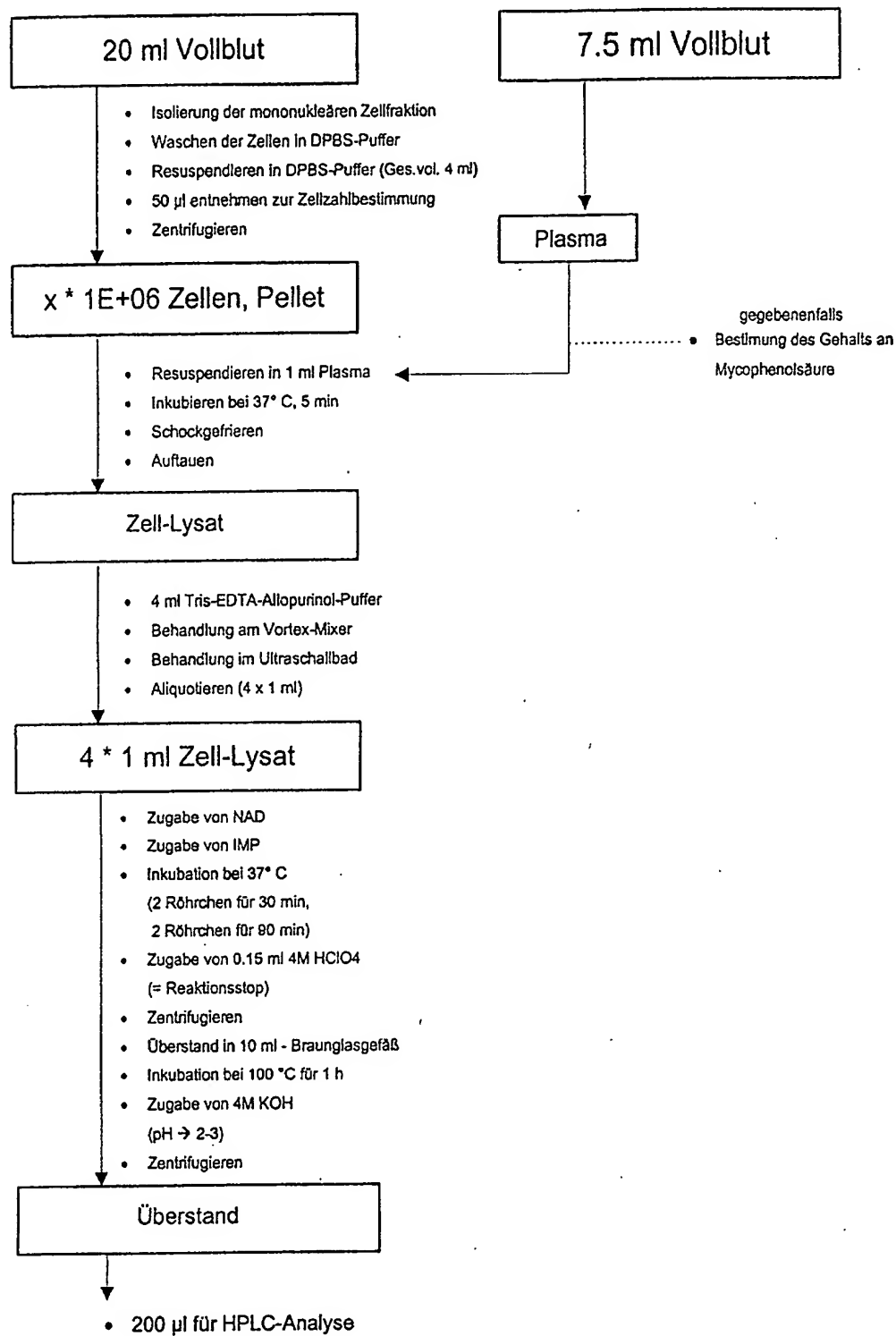


Fig. 3.

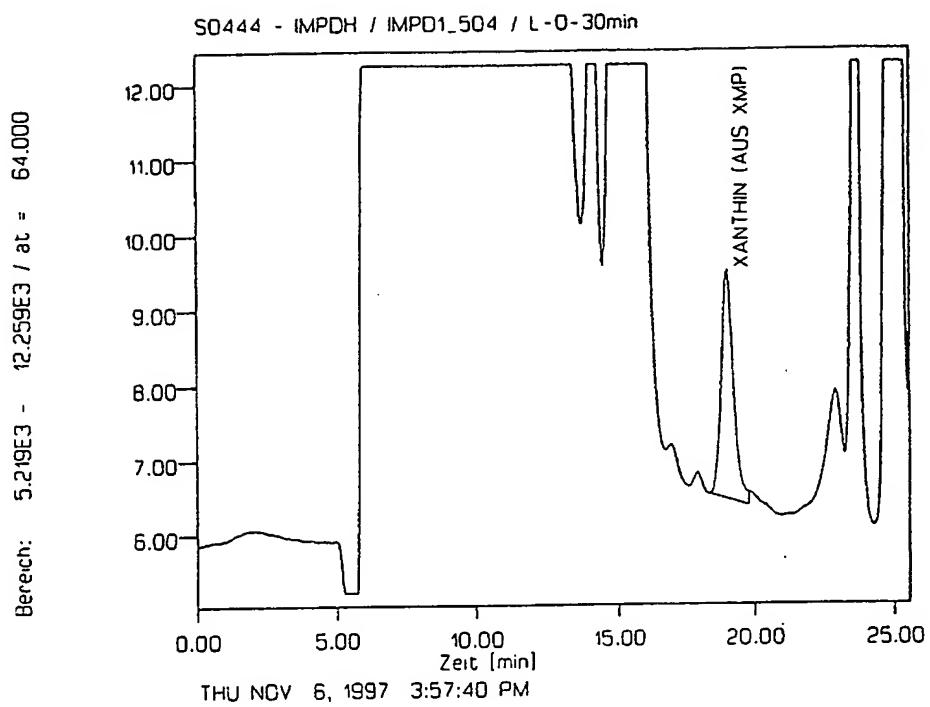


Fig. 4.

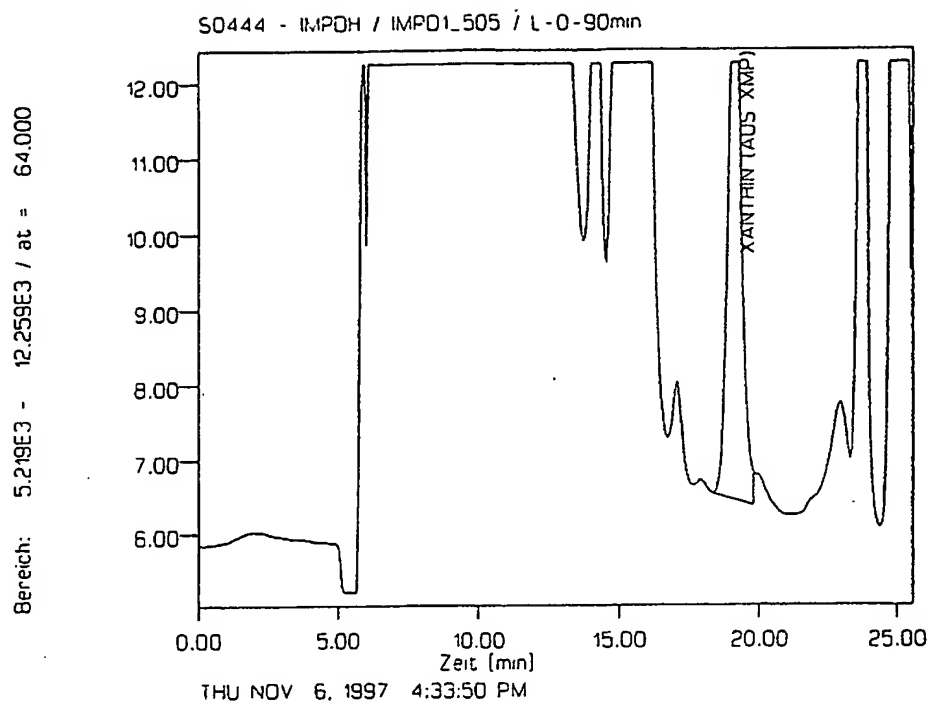


Fig. 5.

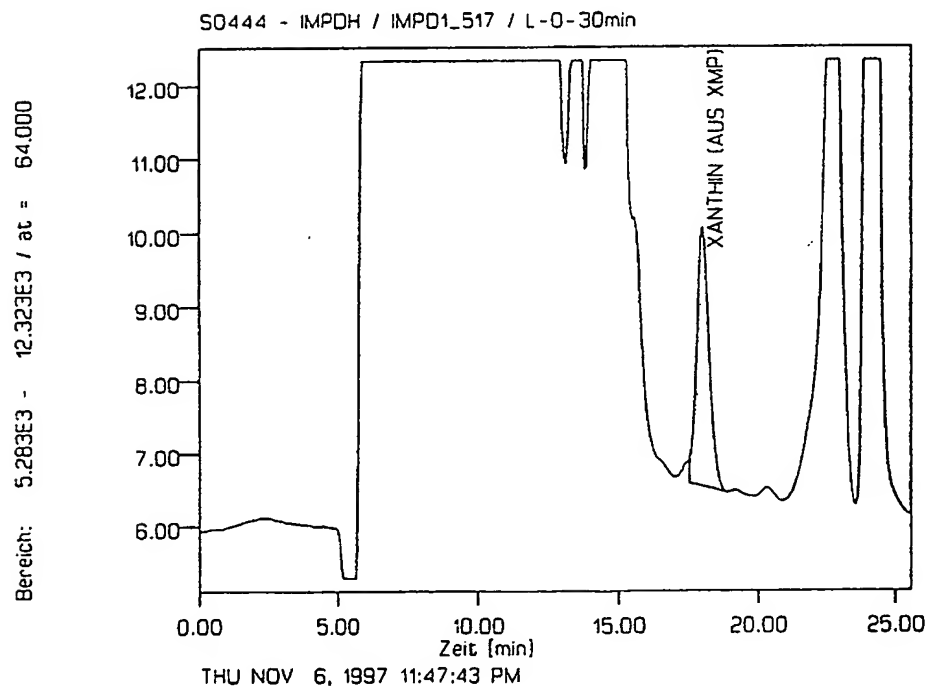


Fig. 6.

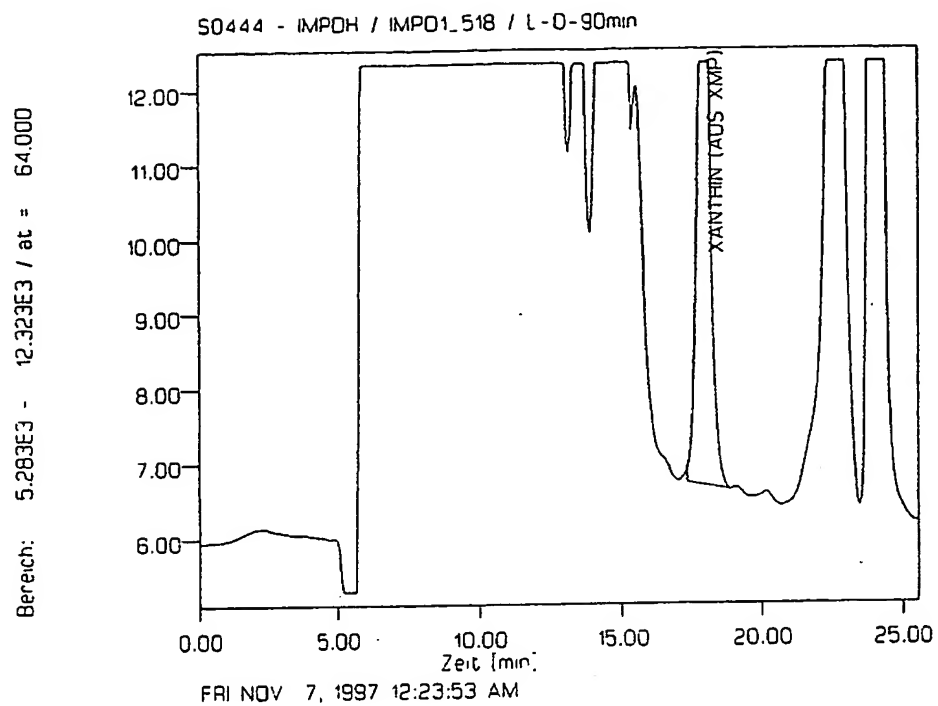


Fig. 7.

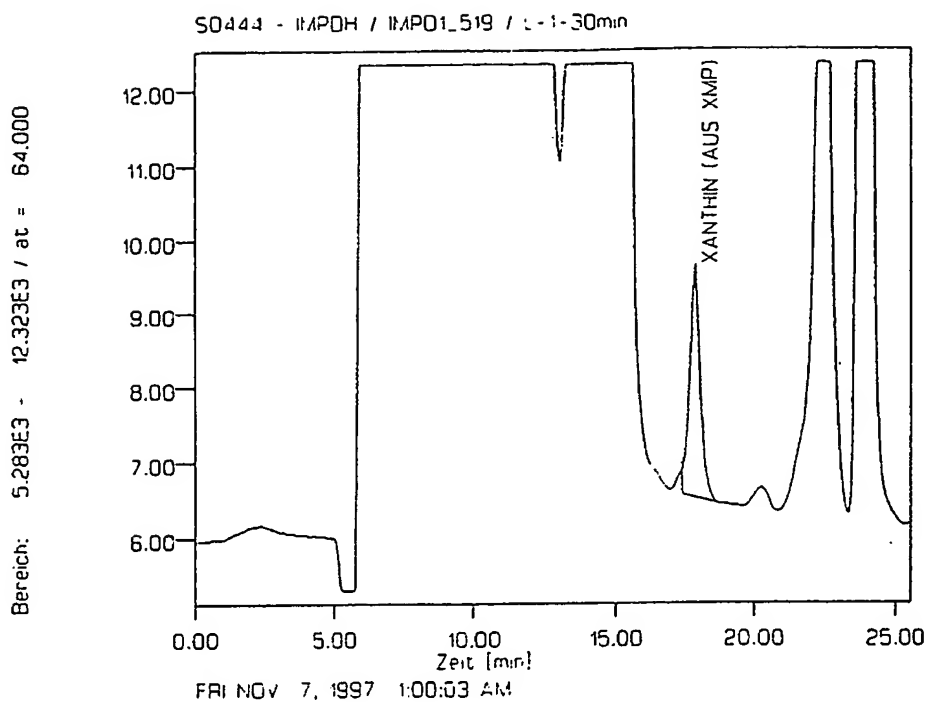


Fig. 8.

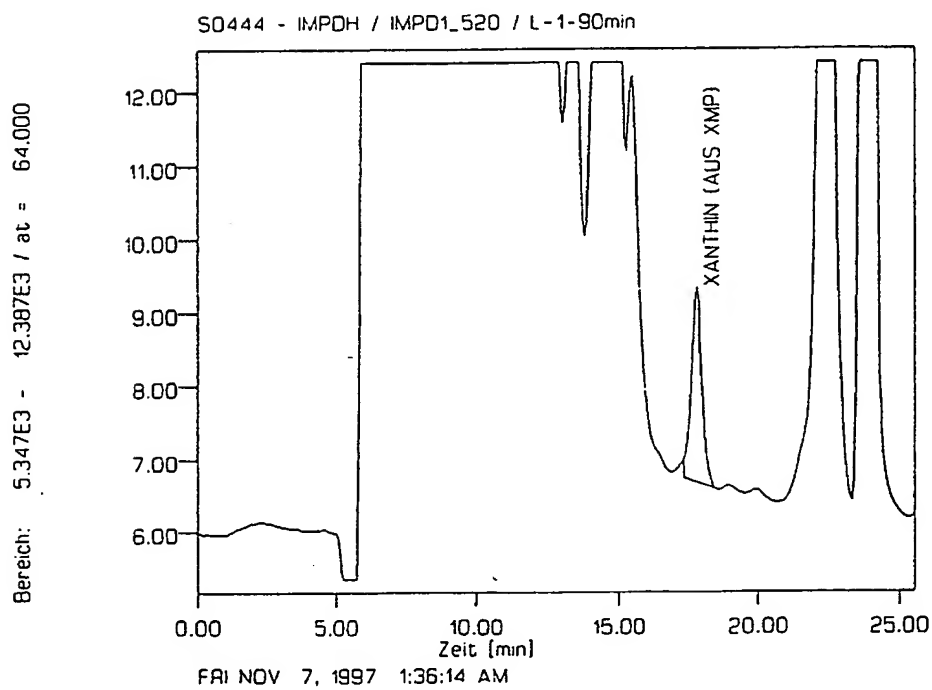


Fig. 9.

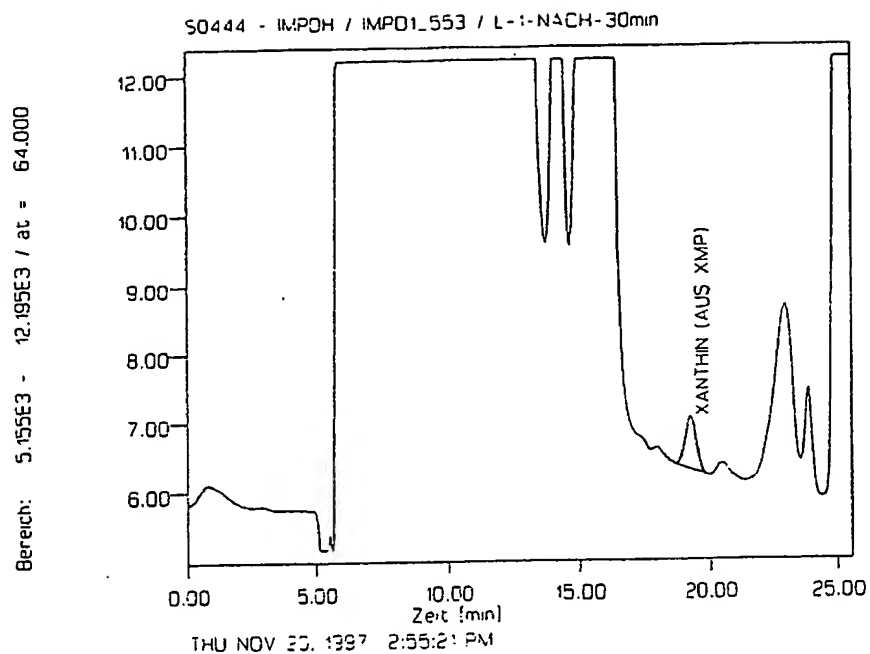


Fig. 10.

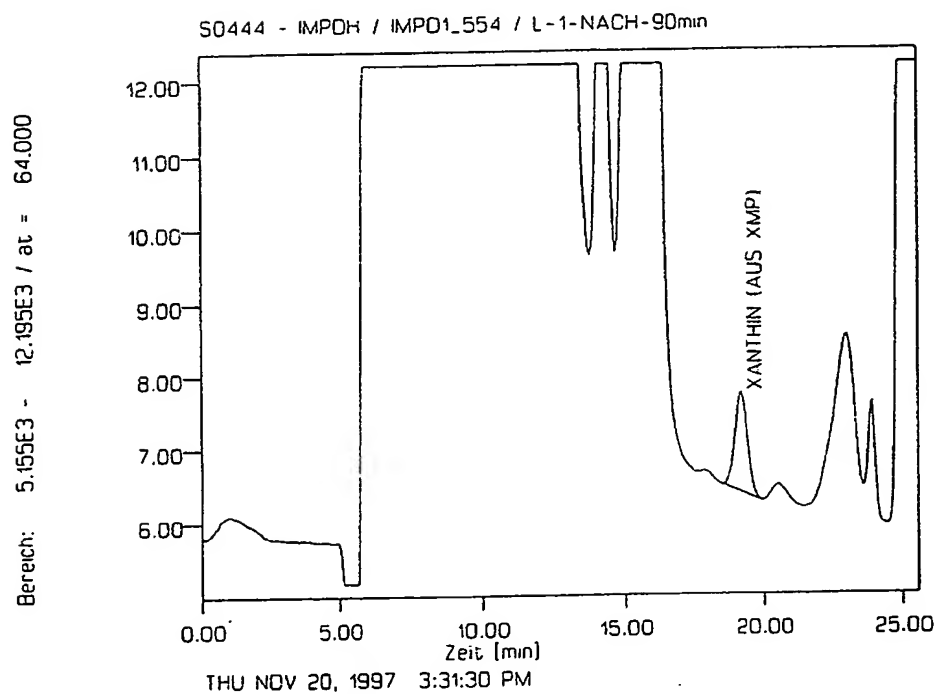


Fig 11.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.